INDUKSI KALUS UWI UNGU (*Dioscorea alata* L.) PADA MEDIA MS DENGAN PENAMBAHAN BAP YANG DIKOMBINASIKAN DENGAN 2,4-D

CALLUS INDUCTION OF PURPLE YAM (*Dioscorea alata* L.) ON MS MEDIUM CONTAINING BAP IN COMBINATION WITH 2,4-D

*Rudiyanto, Dyah Retno Wulandari dan Tri Muji Ermayanti

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong, Bogor, 16911
*Email: rudi006@lipi.go.id

ABSTRAK

Uwi ungu (*Dioscorea alata* L) merupakan tanaman herba monokotil yang menghasilkan umbi. Umbi uwi ungu mengandung karbohidrat dan berserat tinggi sehingga sangat potensial sebagai pangan fungsional. Perbanyakan uwi ungu secara konvensional adalah dengan umbinya. Keterbatasan pengadaan bibit dapat diatasi dengan teknik kultur jaringan. Modifikasi media diperlukan untuk mendapatkan pertumbuhan terbaik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian BAP yang dikombinasikan dengan 2,4-D pada media MS terhadap pembentukan kalus uwi ungu secara *in vitro*. Rancangan percobaan berupa rancangan acak lengkap faktorial menggunakan dua faktor yakni 0.0, 1.0 dan 1 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.0, 0.5, 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D. Parameter pertumbuhan yang diamati meliputi persentase terbentuknya kalus dan diameter kalus yang diamati setiap minggu dari umur 0-8 minggu setelah kultur serta quadran terbentuknya kalus dan kondisi eksplan pada umur 8 minggu. Pada hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian 0.0 dan 2.0 mg/l BAP yang ditambahkan dengan 0.5 mg/l 2,4-D menghasilkan persentase terbentuknya kalus, diameter kalus serta nilai kisaran quadran membentuk kalus yang tinggi. Pada kontrol dan perlakuan 1 mg/l BAP yang ditambahkan dengan 2 mg/l 2,4-D tidak terbentuk kalus. Eksplan uwi ungu pada perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l BAP yang ditambahkan dengan 2 mg/l 2,4-D mengalami pencoklatan dan layu.

Kata kunci: *Dioscorea alata.*, BAP, 2,4-D*, in vitro*, kalus

ABSTRACT

Purple yam (*Dioscorea alata* L) is a monocotyledonous plant produces tubers. Purple yam tuber contains high carbohydrate and fiber, so it is very potential as a functional food. Conventional propagation of purple yam is by its tuber. Tissue culture techniques can be applied to overcome the problem in its conventional propagation. Modification of media needs to be done to obtain the best growth of purple yam culture. The aims of this research was to investigate the addition of BAP in combination with 2,4-D on MS medium on *in vitro D. alata* callus formation. Experimental design was completely randomized design factorial using two factors: 0.0, 1.0 and 1 mg/l BAP in combination with 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l 2,4-D. The growth parameters observed was

percentage of callus formation and callus diameter which observed weekly from 0 to 8 weeks after culture. Quadrant formation and explant conditions was observed at 8 weeks after culture. The results indicate that the addition of 0.0 and 2.0 mg/l BAP with 0.5 mg/l 2,4-D produced highest percentage of callus formation, callus diameter and quadrant range values. In control treatment and 1.0 mg/l BAP in combination with 2.0 mg/l 2,4-D callus was not formed. Explants of *D. alata* at 0.0, 1.0 and 2.0 mg/l BAP in combination with 2.0 mg/l 2,4-D browned and wilted.

Keywords: *Dioscorea alata*., BAP, 2,4-D, *in vitro*, callus

PENDAHULUAN

Tanaman uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) merupakan salah satu jenis tanaman herba monokotil dari famili Dioscoreaceae yang batangnya menjalar dan menghasilkan umbi. Kandungan karbohidrat umbi *D. alata* berkisar 80.71-88,22 mg/100g, protein 4.54-9.87 % dan lemak 0.86-1.86% (Ogidi *et al*, 2017). Tanaman uwi ungu dapat dikembangkan sebagai sumber pangan fungsional karena kandungan karbohidrat yang tinggi. Uwi ungu memiliki kandungan karbohidrat dan serat makanan yang lebih tinggi dibandingkan dengan uwi putih (*D. rotundata*) dan *D. domentroum* (91,3% berbanding 41,3%) (Ihediohanma, 2012). Umbi uwi ungu juga mengandung diosgenin, yang bermanfaat sebagai prekusor dalam sintesis hormon steroid seperti progesteron, kortikosteroid dan anabolik steroid (Saklani *et al*, 2013). Selain itu kandungan antosianin dari uwi ungu relatif stabil pada suhu 30-100°C dan pH 2-12 sehingga sangat berpotensi untuk digunakan sebagai pewarna makanan seperti pada es krim, jus dan permen (Jose dan Muhammed, 2015).

Tanaman *D. alata* belum banyak dibudidayakan oleh petani dalam skala luas. Umumnya *D. alata* tumbuh liar di sekitar hutan atau perkebunan (Hutami *et al*, 2014). Perbanyakan tanaman *D. alata* secara konvensional umumnya menggunakan umbi yang sering terkendala dengan adanya fase dormansi. Perbanyakan tanaman secara *in vitro* perlu dilakukan untuk mendapatkan bibit tanaman *D. alata* yang memiliki sifat genotif yang sama dengan tanaman induk, dapat diperbanyak dalam waktu yang relatif singkat, seragam, serta bebas dari hama dan penyakit atau pathogen (Rodrigues *et al,* 2017). Salah satu teknik mikropropagasi *D. alata* secara *in vitro* adalah melalui pembentukan dan perbanyakan kalus yang kemudian dapat diregenerasikan menjadi tanaman utuh.

Optimasi teknik mikrokropagasi *D. alata* secara *in vitro* perlu terus dilakukan untuk mendapatkan kultur yang memiliki pertumbuhan optimal. Beberapa penelitian telah dilakukan pada tanaman *D. alata* diantaranya perbanyakan tunas menggunakan media MS dengan kombinasi perlakuan 0.5mg/l NAA dengan 2 mg/l BAP yang menghasilkan respon pertumbuhan positif serta laju multiplikasi tinggi. Induksi umbi mikro *D. alata* secara *in vitro* menghasilkan bobot umbi rata-rata 0.969 g pada perlakuan 1 mg/l BAP dengan penambahan 0.5 mg/l NAA dan 0.1 mg/l GA_3 (Edirisinghe *et al*, 2017). Pada media MS dengan penambahan 1.5mg/l Kinetin dan

dengan 2 mg/l IAA menghasilkan proliferasi tunas *D. alata* yang optimal (Das *et al.,* 2013).

Konservasi serta mikropropagasi *D. alata* bebas *Yam Mozaik Virus* telah dilakukan oleh Wulandari dan Ermayanti (2011). Penambahan BAP pada konsentrasi rendah (0.1-0.5 mg/l) hanya menginduksi pertumbuhan 2-7 tunas aksilar, sedangkan penambahan BAP pada konsentrasi 1.0-2.0 mg/l dapat menginduksi 4-7 tunas. Martin *et al*., (2012) telah melakukan percobaan untuk menguji ketahanan *D. alata* terhadap salinitas secara *in vitro*. Pada percobaan tersebut kultur *D. alata* toleran terhadap cekaman NaCl hingga konsentrasi 100 mM NaCl yang ditunjukkan dengan tingginya kandungan prolin pada eksplan (Martin *et al.*, 2012).

Perbanyakan tanaman dapat dilakukan secara konvensional menggunakan umbi namun perbanyakan *in vitro* melalui induksi kalus yang kemudian diregenerasikan menjadi planlet dapat menghasilkan bibit dalam jumlah yang lebih banyak. Bibit tanaman yang tegar dan berproduksi tinggi dapat diperoleh dengan pemilihan jenis eksplan, penggunaan media yang tepat serta zat pengatur tumbuh yang sesuai. Zat pengatur tumbuh TDZ (*thidiazuron*) dan 2,4-D (2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid*) serta beberapa jenis auksin lainnya telah banyak digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus. Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus umumnya eksplan yang mempunyai kemampuan regenerasi yang tinggi dan bersifat meristematik (Kurniati *et al*., 2011).

Salah satu jenis zat pengatur tumbuh auksin yang sering digunakan untuk menginduksi kalus adalah 2,4-D. Proses induksi kalus dapat ditingkatkan dengan mengkombinasikan auksin (2,4-D) dengan sitokinin (Benzyl Adenin ataupun kinetin) (Bhojwani & Razdan, 1996). Kombinasi ZPT terbaik untuk pembentukan kalus pada kultur anter *Anthurium* adalah kombinasi antara 0,5 mg/l 2,4-D dengan 2,0 mg/l TDZ. Pada perlakuan tersebut dapat terbentuk kalus hingga 58%. Sedangkan pada perlakuan 0,5 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 1,0 mg/l TDZ menghasilkan tunas ekplan yang optimal (Winarto *et al*., 2009).

Keberhasilan induksi kalus dan proses regenerasinya menjadi planlet tergantung dari genotipe tanaman, komposisi media yang digunakan serta penggunaan konsentrasi serta kombinasi zat pengatur tumbuh yang tepat. Beberapa studi menunjukkan bahwa induksi kalus tidak hanya tergantung dari jenis tanaman tetapi juga jenis eksplan, intensitas cahaya, suhu dan umur eksplan (Al-Hussaini *et al*., 2015). Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pembentukan kalus *D. alata* dengan pemberian zat pengatur tumbuh BAP serta 2,4-D pada konsentrasi yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

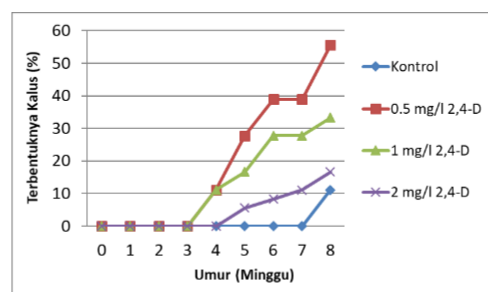
Eksplan berupa helai daun *D. alata* diambil dari planlet yang telah dikulturkan pada media MS (Murashige dan Skoog, 1962) umur 8 minggu. Media yang digunakan adalah media MS dengan penambahan sukrosa 30 g/l dan dipadatkan dengan agar Gelzan (TM Caissonlabs) 3 g/l. Selanjutnya pH Media diatur hingga 5.8 kemudian disterilisasi menggunakan otoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C selama 15 menit. Eksplan yang telah dikulturkan

kemudian ditempatkan ke dalam ruang kultur pada suhu 24 ± 2°C di dalam ruang gelap.

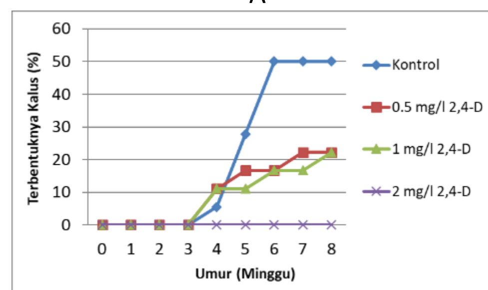
Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap factorial dengan faktor yang diujikan yakni zat pengatur tumbuh BAP dengan konsentrasi 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l yang dikombinasikan dengan 0.0, 0.5, 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D. Setiap perlakuan terdiri dari 4 ulangan (cawan petri), 1 cawan petri berisi 6 eksplan (sub ulangan) sehingga jumlah satuan percobaan adalah sebanyak 288. Variabel yang diamati yakni persentase terbentuknya kalus dan diameter kalus yang diamati setiap minggu dari umur 0 hingga 8 minggu setelah kultur. Sedangkan untuk peubah quadran membentuk kalus, warna dan kondisi eksplan serta pengambilan foto mikroskop dilakukan pada saat eksplan berumur 8 minggu setelah kultur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

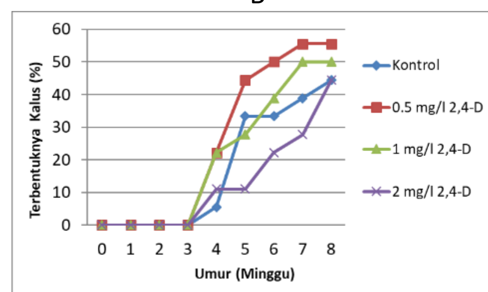
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada media MS yang mengandung 0,5 mg/l 2,4-D tanpa penambahan BAP memberikan respon terbaik dan inisiasi kalus lebih awal dibandingkan perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D. Kalus mulai terbentuk pada umur 4 minggu setelah kultur dan peningkatan persentase eksplan membentuk kalus optimal pada umur 4 hingga umur 8 minggu setelah kultur (Gambar 1A). Pada perlakuan 1 mg/l BAP tanpa penambahan 2,4-D kalus mulai terbentuk pada umur 4 minggu setelah kultur. Pertumbuhan dan pertambahan terbentuknya kalus tertinggi terdapat pada media kontrol. Pada perlakuan 2.0 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 1.0 mg/l BAP tidak terbentuk kalus (Gambar 1B). Pada media MS dengan penambahan 2.0 mg/l BAP persentase terbentuknya kalus yang tinggi terdapat pada perlakuan 0.5 mg.l 2,4-D sedangkan pada perlakuan 0.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D umur 8 minggu persentase terbentuknya kalus lebih rendah dibandingkan perlakuan 0,5 dan 1.0 mg/l 2,4-D (Gambar 1C).



A



B

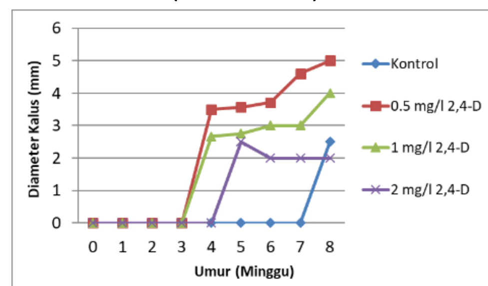


C

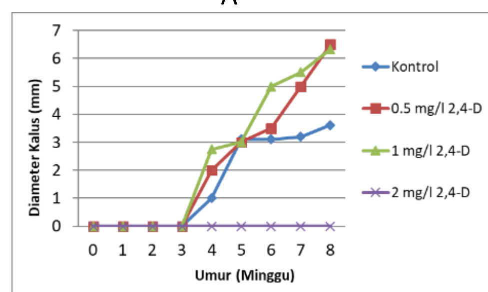
Gambar 1. Persentase terbentuknya kalus kultur *D. alata* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan 0; 0.5; 1 dan 2.5 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0 mg/l BAP (A); 1 mg/l BAP (B) dan 2 mg/l BAP (C)

Jenis eksplan, jenis media dan zat pengatur tumbuh serta umur eksplan dan genotipe tanaman merupakan faktor yang mempengaruhi pembentukan kalus (Kurniati 2011). Zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP yang digunakan berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus dan banyaknya kalus yang dihasilkan. Eksplan yang bersifat meristematik lebih responsif dalam pembentukan kalus. Pembentukan kalus merupakan pembelahan sel yang sangat cepat tanpa melalui tahap differensiasi (Gill *et al*., 2004).

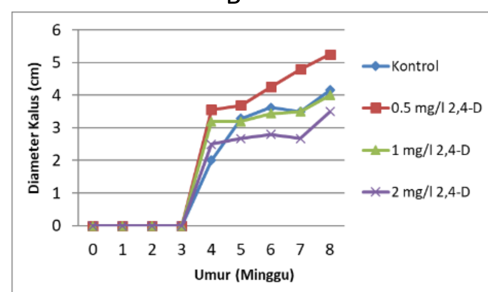
Diameter kalus yang terbentuk pada eksplan *D. alata* pada media MS dengan penambahan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.0, 0.5, 1.0 dan 2.0 2,4-D umur 0 hingga 8 minggu terdapat pada Gambar 2. Pada media kontrol (tanpa penambahan BAP) diameter kalus mulai bertambah pada umur 4 minggu setelah kultur. Pada perlakuan 0.5 mg/l 2,4-D diameter kalus yang terbentuk lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D. Pada perlakuan 2.0 mg/l 2,4-D pertambahan diameter kalus hanya terjadi pada umur 4 dan 5 minggu setelah kultur sedangkan pada perlakuan 0.0 mg/l 2,4-D pertambahan diameter kalus hanya terjadi pada umur 8 minggu (Gambar 2A). Diameter kalus pada media MS dengan penambahan 1.0 mg/l BAP yang dikombinsikan dengan 0.0, 0.5 dan 1.0 mg/l 2,4-D mulai bertambah pada umur 4 minggu setelah kultur. Pada perlakuan 0.5 dan 1.0 mg/l 2,4-D pertambahan diameter kalus optimal pada umur 5-8 minggu. Pada perlakuan tanpa penambahan 2,4-D pertambahan diameter kalus hanya terjadi pada umur 4 dan 5 minggu, sedangkan pada umur 6-8 minggu diameter kalus relatif tidak bertambah. Pada perlakuan 2.0 mg/l 2,4-D tidak terbentuk kalus sehingga tidak terjadi pertambahan diameter kalus (Gambar 2B).



A



B



C

Gambar 2. Rata-rata diameter kalus kultur *D. alata* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan 0; 0.5; 1 dan 2.5 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0 mg/l BAP (A); 1 mg/l BAP (B) dan 2 mg/l BAP (C)

Pada media MS dengan penambahan 2.0 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0.5 mg/l BAP diameter kalus bertambah pada umur 4 minggu dan terus bertambah hingga umur 8 minggu setelah kultur. Pada

perlakuan ini diameter kalus yang terbentuk lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D (Gambar 2C). Kombinasi yang optimum antara auksin dan sitokinin dapat menginduksi kalus secara lebih efektif. Pada media ini sensitivitas sel dari jaringan eksplan diaktifkan kembali pada saat siklus sel dan inisiasi pembentukan embrio melalui pengaktifan gen-gen spesifik untuk induksi kalus (Khumaida dan Handayani, 2010)

Pada perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.5 mg/l 2,4-D kalus yang terbentuk mengalami pertumbuhan lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini karena penggunaan BAP yang dikombinasikan dengan 2,4-D mempunyai daya aktif tinggi menyebabkan kandungan auksin dan sitokinin yang terdapat pada jaringan tanaman meningkat sehingga kalus dapat berkembang lebih optimal. Jaringan dalam eksplan tanaman mengalami stress akibat peningkatan konsentrasi hormon sehingga menstimulasi terjadi pembelahan sel secara terus menerus di dalam jaringan sehingga pada akhirnya kalus terus membelah dan bertambah besar (Rudiyanto *et al*., 2016).

Nilai kisaran persentase terbentuknya kalus, diameter kalus, quadran eksplan terbentuk kalus serta warna dan kondisi eksplan *D.alata* pada media MS dengan penambahan 0.0, 1.0, dan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.0, 0.5, 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D pada umur 8 minggu tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Pembentukan kalus *D. alata* sp umur 8 minggu pada media MS dengan penambahan 0, 1 dan 2 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan: 0; 0.5; 1 dan 2 mg/l 2,4-D

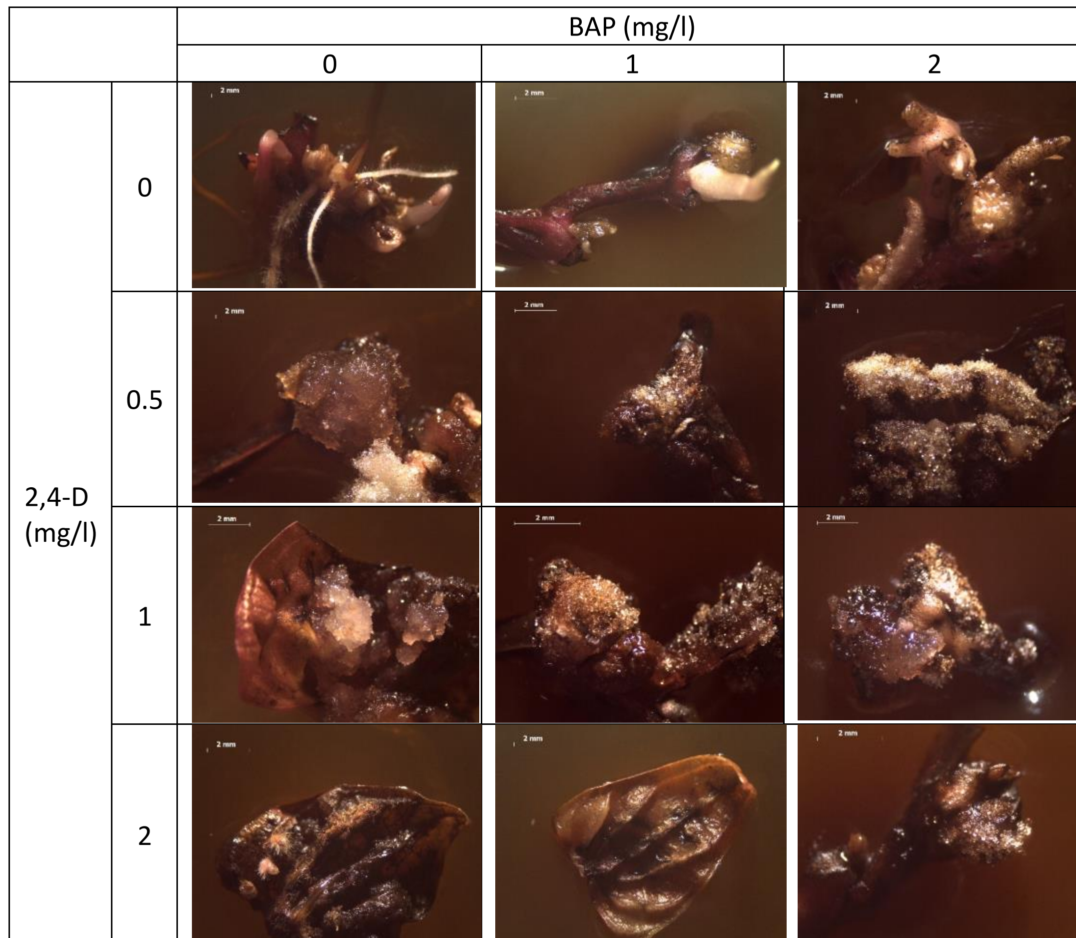
BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Terbentuknya Kalus (%)	Diameter Kalus (mm)	Qudran Eksplan Terbentuk Kalus	Warna dan kondisi eksplan
0	0	0.0-16.7	0.0-0.0	0-0	Ungu-hijau, eksplan segar
	0.5	16.7-83.3	2.0-7.0	1-3	Ungu-hijau, eksplan segar
	1	16.7-50.0	2.0-7.0	1-1	Coklat ungu, sebagian eksplan layu
	2	16.7-16.7	2.0-2.0	1-1	Coklat ungu, sebagian eksplan layu
1	0	33.3-66.67	1.0-5.0	1-2	Ungu-hijau, eksplan segar
	0.5	16.7-33.3	1.0-3.0	1-1	Coklat-Ungu, eksplan segar
	1	16.7-33.3	3.0-12.0	1-4	Ungu-hijau, sebagian eksplan layu
	2	0.0-0.0	0.0-0.0	0-0	Coklat ungu, sebagian besar eksplan layu
2	0	33.3-50.0	1.0-5.0	1-2	Ungu-hijau, eksplan segar
	0.5	33.3-66.67	2.0-8.0	1-4	Coklat-Ungu, eksplan segar
	1	50.0-50.0	1.0-5.0	1-2	Coklat ungu, sebagian eksplan layu
	2	33.3-66.67	2.0-4.0	1-2	Coklat ungu, sebagian eksplan layu

Nilai kisaran persentase terbentuknya kalus yang tinggi terdapat pada perlakuan 0.5 mg/l 2,4-D tanpa penambahan BAP serta perlakuan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.5 mg/l 2,4-D sedangkan pada parameter diameter kalus dan qudran terbentuk kalus nilai kisaran tertinggi terdapat pada perlakuan 1.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 1.0 mg/l 2,4-D. Pada perlakuan 1.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 2.0 mg/l 2,4-D tidak terjadi pembentukan kalus (Tabel 1)

Eksplan pada perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0.0 dan 0.5 mg/l 2,4-D berwarna ungu-hijau dan kondisi eksplan segar sedangkan pada perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 1.0 dan 2.0 mg/l 2,4-D sebagian eksplan mencoklat dan layu (Tabel 1). Dengan semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan maka kondisi eksplan mengalami kelayuan dan mencoklat. Menurut Khumaida (2010) konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda memberikan respon yang berbeda terhadap induksi kalus.

Performa kalus *D.* alata yang ditumbuhkan pada media MS dengan penambahan 0, 1 dan 2 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan: 0; 0.5; 1 dan 2 mg/l 2,4-D umur 8 minggu pada mikroskop stereo dengan perbesaran 10 kali terdapat pada Gambar 3. Pembentukan kalus dimulai dari tahap pembengkakan eksplan kemudian terbentuk kalus berukuran kecil pada ujung eksplan. Eksplan *D. alata* yang dikulturkan pada pada media MS dengan perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 mg/ BAP yang dikombinasikan dengan 0.5 dan 1.0 mg/l 2,4-D terbentuk kalus berukuran sedang-besar berwarna putih-kecoklatan. Kalus *D. alata* yang terbentuk mempunyai diameter berbeda-beda sesuai dengan tingkat konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4-D yang ditambahkan pada media MS. Pada perlakuan 0.0, 1.0 dan 2.0 BAP tanpa penambahan 2,4-D hanya sedikit kalus yang terbentuk pada eksplan. Begitu pula perlakuan 0.0 dan 2.0 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 2.0 mg/l 2,4-D kalus yang terbentuk hanya berukuran kecil di bagian ujung eksplan. Sementara pada perlakuan 1.0 BAP yang dikombinasikan dengan 2.0 mg/l 2,4-D tidak ada kalus yang terbentuk (Gambar 3).

Pada eksplan *Tacca leontopetaloides* tidak seluruh eksplan yang dikulturkan pada media perlakuan mampu membentuk kalus. Kalus yang memiliki diameter tertinggi adalah dari eksplan bonggol yang dikulturkan pada media MS dengan penambahan 1.00 mg/l 2,4-D dan 1.00 mg/l TDZ. Tahap induksi kalus dimulai dengan tahap penebalan bagian eksplan yang terpotong dan mengalami pelukaan. Penebalan dapat terjadi karena adanya interaksi eksplan dengan media tumbuh, zat pengatur tumbuh dan lingkungan tumbuh sehingga jaringan eksplan membesar dan membentuk sel kalus. Sel kalus ini merupakan sel terus mengalami proliferasi tanpa disertai dengan tahap diferensiasi (Rudiyanto *et al.*, 2016).



Gambar 3. Performa kalus *D. alata* umur 8 minggu pada media MS yang mengandung 0, 1 dan 2 mg/l BAP dikombinasikan dengan: 0; 0.5; 1 dan 2 mg/l 2,4-D.

SIMPULAN

1. Persentase terbentuknya kalus, diameter kalus serta nilai kisaran quadran membentuk kalus *D. alata* yang tinggi terdapat pada media MS tanpa BAP dan yang mengandung 2.0 mg/l BAP dikombinasikan dengan 0.5 mg/l 2,4-D.
2. Pada media kontrol dan media yang mengandung 1 mg/l BAP dikombinasikan dengan 2 mg/l 2,4-D kalus tidak terbentuk.
3. Eksplan uwi ungu pada media tanpa BAP dan yang mengandung 1.0 dan 2.0 mg/l BAP dikombinasikan dengan 2 mg/l 2,4-D mengalami pencoklatan dan layu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Deritha Ellfy Rantau SP, Lutvinda Ismanjani dan Evan Maulana S.Si yang telah membantu dalam pembuatan media dan pemeliharaan kultur *D. alata*.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Hussaini, Z.A, Yousif , S.H.A. and AL-Ajeely, S.A. (2015). Effect of Different Medium on Callus Induction and Regeneration in Potato Cultivars. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4 (5): 856 – 865

Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Elsevier. 768p

Das S., M.D. Choudhury and P.B. Mazumda. .(2013). Micropropagation of *Dioscorea alata* L. through Nodal Segments. African *Journal of Biotechnology*. 2 (47): 6611-6617.

Edirisinghe E.S.C., M.W.R.G. Monarawila, K.M.G. Kulathunga, C.H. Denagamage, S.K. Wasala and W.L.G. Samarasinghe. (2017). *In Vitro* Shoot Multiplication and Tuberization of *Dioscorea alata* and *Dioscorea bulbifera*. *Annals of Sri Lanka Departement of Agriculture.* 19:339-350.

Gill N.K, R. Gill and Gisal. (2004). Factors enhancing somatic embriogenesis in Coffee arabica. *Agronomia costarica* 32(1): 139- 147

Hutami S., R. Purnamaningsih, I. Mariska dan S. Diantina. (2014). Multiplikasi Tunas dan Induksi Perakaran pada Ubi Kelapa (*Dioscorea alata* L.) dan Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) secara *In vitro*. *Jurnal Agro Biogen* 10(2):53-60.

Ihediohanma. N.C., N.C. Onuegbu, A.I. Peter-Ikechukwu and N.C. Ojimba. (2012). A Comparative Study and Determination of Glycemic Indices of Three Yam Cultivars (*Dioscorea rotundata*, *Dioscorea alata* and *Dioscorea domentorum*. *Pakistan Journal of Nutrition* 11 (6): 547-552.

Jose A. and R. Muhammed. (2015). Extraction and Evaluation of Anthocyanin from *Dioscoreaalata* (L.) for Its Application as a Natural Food Colour. *The International Journal of Science & Technology*, September 2015. 3 (9) :41-47.

Khumaida, N., dan T, Handayani. (2010). Induksi dan Proliferasi Kalus Embriogenik pada Beberapa Genotipe Kedelai. Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB. Bogor.

Kurniati, R., A. Purwito, G.A. Wattimena, B. Marwoto dan Supenti. (2011). Induksi Kalus Tiga Kultivar Lili (*Lilium* sp.) dari Petal Bunga pada Beberapa Media. Prosiding Seminar Nasional PERHORTI. 1244-1250

Martin A.F., F. Azizah, D.R. Wulandari and T.M. Ermayanti. (2012). The Effect of Increase in NaCl concentration on growth and proline content of Purple Yam (*Dioscorae alata* L.) Grown *In Vitro*. *Annales Bogorienses* 16 (2) : 13-18.

Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497

Ogidi I.A., Wariboko C. and A. Alamene. (2017). Evaluation of Some Nutritional Properties of Water Yam (*Dioscorea alata*) Cultivars in Bayelsa State, Nigeria. *European Journal of Food Science and Technology*. 5 (3) : 1-14.

Rudiyanto, A.F. Martin dan T.M. Ermayanti. (2016). Perlakuan Konsentrasi 2,4-

Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dan *Thidiazuron* (TDZ) Terhadap Pembentukan Kalus Pada Helai Daun, Tangkai Daun dan Bonggol *Tacca leontopetaloides*. Prosiding Seminar Nasional XXV "Kimia dalam Pembangunan ". 129-134

Rodrigues F.A., R.A.L.S. Rezende, J.D. Rodrigues, V.A. Rodrigues, M. Pasqual and S. de-Oliveira e-Silva. (2017). Application of Silicon Sources in Yam (*Dioscorea* spp) Micropropagation. *Australian Journal of Crop Science.* (11): 1469-1473.

Saklani S., S. Chandra and A.P. Mishra. (2013). Nutritional Profile, Anti Nutritional Profile and Phytochemical Screening of Garhwal Himalaya Medical Plant *Dioscorea alata* Tuber. *International Journal of Pharmaceutical Science Review Resesarch,* 23(2) 42-46.

Winarto, B., F. Rachmawati, N.A. Mattjik, A. Purwito dan B. Marwoto. (2009). Pengembangan Formulasi Medium Dasar untuk Kultur Anther Anthurium. *Jurnal Agronomi Indonesia* 37 (2): 138 – 144

Wulandari, D.R. and T.M. Ermayanti. (2011). Detection of Potyvirus using RT-PCR and ACP-ELISA for *In Vitro* Conservation of Virus-Free *Dioscorea* species. *Annales Bogorienses.* 15 (2) : 1-8.